

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-120225

(43)Date of publication of application : 22.05.1991

(51)Int.Cl.

A61K 37/02
// A61K 37/16
A61K 37/64

(21)Application number : 01-259779

(71)Applicant : AJINOMOTO CO INC

(22)Date of filing : 04.10.1989

(72)Inventor : KOMURA MASANORI
NIO NORIKI
ARIYOSHI YASUO

(54) NEW PEPTIDE AND ANTIHYPERTENSIVE AGENT CONTAINING SAME PEPTIDE

(57)Abstract:

NEW MATERIAL: A peptide expressed by formula I to formula VI and salt thereof.

USE: The novel peptide has angiotensin conversion enzyme inhibiting action and is blended with a physiologically functional food or medicine as an active ingredient for antihypertensive agent. Dose and administration amount thereof is 0.01-10mg 1-3 times daily.

PREPARATION: A raw material having a reactive carboxyl group corresponding to either one of two fragments divided into two in arbitrary position of peptide bond is condensed with a raw material having a reactive amino group corresponding to other fragment using dicyclohexylcarbodiimide method according to a solid method ordinarily used in peptide synthesis and as necessary protecting group is removed to provide the novel peptide.

Glu-Lys-Thr-Ala-Pro I

Ile-Ala-Ile-Pro II

Ala-Ile-Pro III

Ile-Ala-Ile-Pro-Pro IV

Ala-Ile-Pro-Pro V

Ile-Pro-Pro VI

BEST AVAILABLE COPY

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-120225

⑬ Int. Cl.³
A 61 K 37/02
// A 61 K 37/16
37/64

識別記号
ABU

庁内整理番号
8615-4C
8615-4C
8615-4C

⑭ 公開 平成3年(1991)5月22日

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全6頁)

⑮ 発明の名称 新規ペプチドおよびこれを含有する降圧剤

⑯ 特 願 平1-259779

⑰ 出 願 平1(1989)10月4日

⑱ 発 明 者 香 村 正 徳 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央
研究所内

⑲ 発 明 者 丹 尾 式 希 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央
研究所内

⑳ 発 明 者 有 吉 安 男 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央
研究所内

㉑ 出 願 人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号

㉒ 代 理 人 弁理士 石田 康昌

明 細 書

1. 発明の名称

新規ペプチドおよびこれを含有する降圧剤

2. 特許請求の範囲

1. 下記構造式のいずれかで示されるペプチド
およびその塩。

<Glu-Lys-Thr-Ala-Pro

Ile-Ala-Ile-Pro

Ala-Ile-Pro

Ile-Ala-Ile-Pro-Pro

Ala-Ile-Pro-Pro

Ile-Pro-Pro

2. 下記構造式のいずれかで示されるペプチド
又はその医薬上許容される塩を有効成分として含
有する降圧剤。

<Glu-Lys-Thr-Ala-Pro

Ile-Ala-Ile-Pro

Ala-Ile-Pro

Ile-Ala-Ile-Pro-Pro

Ala-Ile-Pro-Pro

Ile-Pro-Pro

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、新規ペプチドおよびこれを含有する
降圧剤に関する。

従来の技術

近年、牛乳カゼイン等の食品蛋白質の酵素分解
物中にオピオイドペプチド(I)、Ca吸収促進ペプ
チド、アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド(II)等、
種々の薬理活性ペプチドが存在することが報告さ
れてきた。これは、食品が単に栄養面での重要性
を持つだけでなく、外在性の因子として生体の制
御に関与している可能性を示していると考えられ
る、しかしこのようなペプチドの生理的意義は今
のところほとんど明らかにされていない。

参考文献

(I): 1) V. Brantl, H. Teschemacher, A.
Henshen, and F. Lottspeich, Hoppe-Seyler's
Z. Physiol. Chem. 360, 1211(1979) .

2) S. Loukas, D. Varoucha, C. Zioudrou,

R. A. Streaty and W. A. Elee, Biochemistry, **22**, 4567(1983).

(2) : S. Maruyama, K. Nakagomi, N. Tomizuka, and H. Suzuki, Agric. Biol. Chem., **49** (5), 1405(1985)

一方、従来の医薬品は、多くの場合副作用等を有し安全性の問題を抱えてきたため、副作用が少なく、安全性の高い薬剤の開発が重要な課題となっている。上記のような食品蛋白質由来のペプチドを、機能性食品、医薬品等として利用する場合、これらの起源が日常我々が摂取する食品であることから、極めて安全性の高いものが得られると考えられる。さらに人間にとっては異種タンパクである牛乳カゼインではなく、人乳カゼインを用い、この中から薬理活性ペプチドを見い出すことにより、より安全性の高いものを得ることが可能である。しかし人乳カゼインを量的に得ることは困難であり、また酵素分解による方法では、用いる酵素の基質特異性や反応条件等により、生じるペプチドが変化して目的ペプチドが得られるとは限ら

塩の形態の場合、その塩類としては、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩および酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、酒石酸塩、乳酸塩、メタンスルホン酸塩、パートルエンスルホン酸塩等の有機酸塩が挙げられる。なお、降圧剤に含有する場合は、機能性食品、医薬品として許容される塩の形態をとる。

ペプチドを構成するアミノ酸は、天然に存在するという点でしー体が望ましい。

本発明のペプチドはペプチド合成に通常用いられる固相法で、ペプチド結合の任意の位置で二分される2種のフラグメントの一方に相当する反応性カルボキシル基を有する原料と、他方のフラグメントに相当する反応性アミノ基を有する原料をジシクロヘキシルカルボジイミドを用いて縮合させ、生成する縮合物が保護基を有する場合、その保護基を除去させることにより製造し得る。

この反応工程において反応に関与すべきでない官能基は、保護基により保護される。アミノ基の

ない。

発明が解決しようとする課題

量が短いペプチドで前記薬理活性が高く機能性食品、医薬品に適したものの開発が期待されている。

課題を解決するための手段

前記問題点を解決すべく鋭意検討を重ねた結果本発明者らは構造既知のヒトκ-カゼイン中のペプチドフラグメントを種々検討し、下記ペプチドを新規に合成することに成功し、かつ、降圧剤として優れていることを見出し、本発明を完成するに至った。即ち、本発明は、下記構造式のいずれかで示される新規ペプチドおよびその塩、及びこれらの少なくとも一種を有効成分として含有する降圧剤である。

<Glu-Lys-Thr-Ala-Pro

Ile-Ala-Ile-Pro

Ala-Ile-Pro

Ile-Ala-Ile-Pro-Pro

Ala-Ile-Pro-Pro

Ile-Pro-Pro

保護基としては、例えばベンジルオキシカルボニル、t-ブチルオキシカルボニル、p-ヒフェニルイソプロピルオキシカルボニル、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル等が挙げられる。C端のカルボキシル基はクロルメチル樹脂、オキシメチル樹脂、p-アルコキシベンジルアルコール樹脂等の担体に結合している。

縮合反応は、ジシクロヘキシルカルボジイミド等の縮合剤の存在下にて実施する。

縮合反応終了後、保護基は除去され、さらにペプチドのC端と樹脂との結合を切断する。

さらに、本発明の新規ペプチドは通常の方法に従い精製される。例えばイオン交換クロマトグラフィー、逆相液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等が挙げられる。

本発明の降圧剤の有効成分として使用するペプチドまたはその塩の摂取法としては、経口摂取、経口投与、非経口投与、直腸内投与のいずれでもよいが、機能性食品、医薬品として経口摂取、経口投与が好ましい。本発明のペプチドまたはその

塩の摂取量、投与量は、化合物の種類、摂取方法、投与方法、健康人あるいは患者の症状・年齢等により異なるが、通常1回0.001～1000mg、好ましくは0.01～10mgを1日当り1～3回である。本発明のペプチドまたはその塩は通常、食品担体、製剤用担体と混合して調製した食品、製剤の形で投与される。食品、製剤用担体としては、食品分野、製剤分野において常用され、かつ本発明のペプチドまたはその塩と反応しない食品、物質が用いられる。具体的には、例えば乳糖、ブドウ糖、マンニト、デキストリン、シクロデキストリン、デンプン、蔗糖、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム、合成ケイ酸アルミニウム、結晶セルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルデンプン、カルボキシメチルセルロースカルシウム、イオン交換樹脂、メチルセルロース、ゼラチン、アラビアゴム、ヒドロキシプロピルセルロース、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニル

アルコール、軽質無水ケイ酸、ステアリン酸マグネシウム、タルク、トラガント、ベントナイト、ビーガム、カルボキシビニルポリマー、酸化チタン、ソルビタン脂肪酸エステル、ラウリル硫酸ナトリウム、グリセリン、脂肪酸グリセリンエステル、精製ラノリン、グリセロゼラチン、ポリソルベート、マクロゴール、植物油、ロウ、流動パラフィン、白色ワセリン、フルオロカーボン、非イオン界面活性剤、プロピレングリコール、水等が挙げられる。剤型としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤、懸濁剤、坐剤、軟膏、クリーム剤、ゲル剤、貼付剤、吸入剤、注射剤等が挙げられる。これらの製剤は常法に従って調製される。なお液体食品、液体製剤にあつては、用時、水又は他の適当な媒体に溶解又は懸濁する形であってもよい。また錠剤、顆粒剤は周知の方法でコーティングしてもよい。注射剤の場合には、本発明のペプチドまたはその塩を水に溶解させて調製されるが、必要に応じて生理食塩水あるいはブドウ糖溶液に溶解させてもよく、また緩衝剤や

保存剤を添加してもよい。

これらの食品、製剤は、本発明のペプチドまたはその塩を0.2%以上、好ましくは0.5～70%の割合で含有することができる。これらの食品、製剤は、機能性食品としてあるいは治療上価値ある他の成分を含有していてもよい。

実施例

以下、実施例により本発明を具体的に説明する。

なお、本明細書中で用いた略号は、次の意味を有する。

Ala アラニン（以下アミノ酸は全てL体）。

Arg アルギニン

Asn アスパラギン

Asp アスパラギン酸

Gln グルタミン

Glu グルタミン酸

<Glu ビログルタミン酸

Gly グリシン

His ヒスチジン

Ile イソロイシン

Leu ロイシン

Lys リジン

Met メチオニン

Phe フェニルアラニン

Pro プロリン

Ser セリン

Thr スレオニン

Irp トリアプトファン

Tyr チロシン

Val バリン

Boc t-ブチルオキシカルボニル基

Fmoc 9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基

HOBt 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール

DMP ジメチルホルムアミド

Bu^t t-ブチル基

EDTA エチレンジアミン四酢酸

TLC 薄層クロマトグラフィー

実施例1

<Glu-Lys-Thr-Ala-Pro

Fmoc-Pro樹脂 (Fmoc-Pro OH が0.55ミリモル/g樹脂の割合で導入されているp-アルコキシベンジルアルコール樹脂) 154mgを振とうできるように装置した Merrifield の固相法用反応装置にとり、DMF (5ml) に懸濁し30分間振とうし、Fmoc-Pro樹脂を膨潤させた。

これを、以下のFmoc基除去サイクルに付した。

a) DMF 5ml中、1分間振とう (1回)。

b) 50%ピペリジン-DMF溶液 5ml中、3分間振とう。

c) 50%ピペリジン-DMF溶液 5ml中で10分間振とうし、Fmoc基を脱離する。

d) DMF 5mlで4回洗浄。

e) イソプロパノール 5mlで1回洗浄。

ここで、Kaiser法 (E. Kaiser et al., Anal. Biochem. 34, 595(1970)) により、Fmoc基が完全に除去したことを確認し、もし、不完全ならば上記の除去サイクルを繰り返した。また、完全に除去されているならば、以下に示す縮合サイクルに供した。

35分間振とうし、Fmoc基を脱離する。

n) DMF 5mlで4回洗浄。

o) イソプロパノール 5mlで1回洗浄。

ここで、Kaiser法によってFmoc基が除去されていることを確認した。そしてg) ステップをFmoc-Thr(Bu^t)-OHで行なう縮合サイクルに付した。以後同様に、Fmoc基除去サイクルとFmocアミノ酸縮合サイクルを繰り返してFmoc-Lys(Boc)OHとZ-Gluを縮合する。こうしてえられるZ-Glu-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Ala-Pro-樹脂を樹脂からの脱離工程に供した。

すなわち、樹脂を反応容器にとり、塩化メチレン 5mlで2回洗浄し、塩化メチレン (10ml) - アニソール (2.00ml) - チオフェノール (0.7ml) 混合溶液に懸濁、続いて、トリフルオロ酢酸 (20ml) - 塩化メチレン (2.3ml) を加え、1時間振とうした。樹脂をろ過し、得られたろ液を減圧濃縮して、残渣にエーテルを加え、ろ過することによって、得られる白色粉末を反応容器にとり、チオアニソール (1.5ml) - チオ

f) Fmoc基除去サイクルで得られたH-Pro樹脂をDMF 20mlで2回振とうすることによって膨潤させた。

g) Fmoc-Ala-OH (93mg、0.30ミリモル)、HOBt (41mg、0.30ミリモル) のDMF溶液 (5ml) を加え、1分間振とうする。

h) 1Mジシクロヘキシルカルボジイミド塩化メチレン溶液 0.30mlを添加し、70分間振とうする。

i) DMF 5mlで1回洗浄。

j) イソプロパノール 5mlで2回洗浄。

ここで、Kaiser法によって縮合が完了しているか否かを確認し、もし、不完全ならば、上記の縮合サイクルを繰り返した。

Fmoc-Pro-樹脂を用いている場合は、ここでのFmoc基除去サイクルとして以下の方法を用いた。

k) DMF 5ml中、1分間振とう (1回)。

l) 0.2%ピペリジン-DMF溶液 5ml中、5分間振とう。

m) 0.2%ピペリジン-DMF溶液 5ml中で

フェノール (0.5ml) - TPA (13.5ml) を加え、5時間振とうした。エーテルを加え得られた粉末を逆相液体クロマトグラフィーに供し、求める<Gly-Lys-Thr-Ala-Pro>画分を分取し、得られる溶出画分を濃縮乾固する。ついで、蒸留水を加え数回濃縮乾固を繰り返した後、少量の蒸留水にとかし、凍結乾燥する。こうして精製された<Glu-Lys-Thr-Ala-Pro>を得た。精製物の一部をとり、元素分析をおこなったところ、分子式 $C_{23}H_{33}N_3O_8 \cdot CF_3COOH \cdot 2H_2O$ のとき分析値 C, 44.14 H, 6.28 N 12.16となり計算値 C, 44.37 H 6.41 N 12.42 と一致した。

また、FAB質量分析器による分子量測定を行って $m/z : 527 (M^+ + H)$ となり理論値に一致した。さらに、6N-HCl水溶液で加水分解し、アミノ酸分析に供したところ Glu 1.00, Thr 0.97, Pro 1.00, Ala 0.99, Lys 1.00の比となりこれもまた理論値と一致した。従って、求めるペプチドが合成されていることが確認された。

純度は、薄層クロマトグラフィーと逆相液体ク

ロマトグラフィーで純度よく合成されていることを確認した。

前記同様の反応、処理を行ない下記のペプチドを合成した。

	ペプチド	収率 (%)	TLC* Rf	質量分析	元素分析 (上段:実測値 下段:理論値)	アミノ酸分析
実施例2	Ile-Ala-Ile-Pro	39.6	0.52	413	47.57 7.02 10.10 (47.73 7.28 10.12)	P, 1.02(1); A, 1.00(1); I, 1.91(2).
" 3	Ala-Ile-Pro	68.8	0.46	300	43.68 6.63 9.47 (43.63 6.64 9.54)	P, 1.01(1); A, 1.00(1); I, 0.95(1).
" 4	Ile-Ala-Ile-Pro-Pro	83.2	0.42	510	48.13 6.71 10.02 (48.23 6.82 10.30)	P, 2.02(2); A, 1.02(1); I, 1.96(2).
" 5	Ala-Ile-Pro-Pro	44.8	0.38	397	46.15 6.82 10.25 (45.88 6.58 10.11)	P, 2.01(2); A, 1.00(1); I, 0.98(1).
" 6	Ile-Pro-Pro	42.8	0.34	326	47.26 6.61 9.19 (47.30 6.79 9.15)	P, 1.99(2); I, 1.01(1).

* ブタノール:酢酸:水=4:1:2

I, Thr; E, Glu; P, Pro; A, Ala
K, Lys; I, Ile.

実施例14 活性試験

本発明のペプチドまたはその塩は、アンジオテンシン変換酵素阻害作用を有する。以下に酵素阻害作用について説明する。

各ペプチド試料溶液100 μ lに、225 μ lの10mM p-ヒドロキシベンゾイルグリシル-L-ヒスチジル-L-ロイシン、2.5mM 4-アミノアンチピリン、3ユニット/ml ヒブリカーゼ(0.7M NaCl 含む0.12M ホウ酸緩衝液の溶液)を加え37℃で3分間保温後、約70ミリユニットのウサギ肺アンジオテンシン変換酵素を加え反応を開始した。20分間37℃に保温後、750 μ lの3mM EDTA、0.2% トライトンX-100、6.5mM 過ヨウ素酸ナトリウム溶液を加え反応を停止した後、引き続き3分間保温して発色させ、反応溶液を精製水を対照として波長505nmで比色定量した。

阻害率50%の時の試料の濃度をIC₅₀値として、本発明のペプチドの一部についての値を表1に示す。

表 1

試験化合物	IC ₅₀ (単位: μ M)
<Glu-Lys-Thr-Ala-Pro	36
Ile-Ala-Ile-Pro	470
Ala-Ile-Pro	350
Ile-Ala-Ile-Pro-Pro	600
Ala-Ile-Pro-Pro	900
Ile-Pro-Pro	5.0

上表の結果より、本発明のペプチドはアンジオテンシン変換酵素に対して阻害作用を有するという知見を得た。

発明の効果

以上の結果から、本発明の新規ペプチドは降圧剤として有用であり、本発明は医薬及び食品産業上重要である。

特許出願人 味の素株式会社
代理人 弁理士 石田 康 昌